

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Kateřina Dostálová

**Vývoj experimentálního savčího modelu pro studium
genetického onemocnění cystická fibrosa**

**Development of an experimental mammalian model for the
study of genetic disease cystic fibrosis**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod odborným vedením Prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Kateřina Dostálová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu mé práce Prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za odborné vedení této bakalářské práce, za množství cenných rad a připomínek při jejím vypracovávání.

Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Boženě Kubíčkové za pomoc, ochotu a spolupráci při experimentální činnosti.

Abstrakt

Cystická fibróza (CF) je vrozené dědičné onemocnění, které je vyvolané mutací genu pro protein CFTR („Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“). Nejzávažnější komplikací tohoto onemocnění je chronická infekce dýchacích cest způsobená bakterií *Pseudomonas aeruginosa* (PA), která vede k následnému úmrtí pacientů. Nejčastěji je tato infekce léčena antibiotiky. Značným problémem je, že tyto bakterie získávají rezistenci vůči nim a antibiotika přestávají být účinné. Z toho důvodu jsou hledány alternativní terapeutické postupy. Jednou ze studovaných možností je pasivní imunizace slepičími protilátkami proti virulenčnímu faktoru PA, lektinu PAIII. Je prokázáno, že tyto protilátky dokáží bránit adhezi bakterií na povrchu plicního epitelu nemocných s CF. Pro účely pasivní imunizace byla studována jejich inhalace ve formě aerosolu experimentálními zvířaty. Bylo třeba zjistit jaké množství protilátky je inhalováno do dýchacího systému. Experimentálním zvířecím modelem byly myši kmene IRC CD1. Pro to, aby mohla být protilátka kvantifikována, musela být nejdříve označena pomocí fluorescenčního barviva FITC (fluorescein isothiokyanát). Značená protilátka byla následně aplikována myši pomocí neinvazivní intratracheální instilace a bylo zjišťováno jaké množství protilátky lze získat pomocí bronchoalveolární laváže (BAL) plic. Přibližně 31 % z celkového množství je možné detekovat v BAL. Na základě tohoto výsledku bylo možné určit, kolik protilátky zvířata nainhalovala. Bylo zjištěno, že z celkového množství slepičí protilátky, kterému byla zvířata vystavena při inhalaci, se do dýchacích cest dostalo 0,31 %, což odpovídá 31 µg protilátky. Toto množství specifické protilátky by mělo být dostatečné v obraně proti adhezi PA na povrch plic.

Klíčová slova

cystická fibróza, slepičí protilátky, fluorescein isothiokyanát, bronchoalveolární laváž

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is a congenital hereditary disease that is caused by CFTR („Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) mutation. The most serious complication of this disease is chronic infection of respiratory system that is caused by bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (PA) which leads to subsequent death of patients. This infection is very often treated with antibiotics. The biggest problem is that these bacteria get resistance to them and antibiotics are not effective. For this reason, alternative therapeutic procedures are sought. One of the studied possibilities is passive immunization by hen yolk antibodies against virulence factor PA, lectin PAIIL. It has been proven, that hen egg yolk antibodies prevents adhesion of bacteria to the lung epithelium of CF patients. For the purpose of passive immunization, inhalation of hen egg yolk antibodies in the form of aerosols was studied by experimentals on animals. It was necessary to determine the amount of antibody inhaled into respiratory system. As an experimental animal model was used mouse strains ICR CD1. Antibody had to be labeled with fluorescent dye FITC (fluorescein isothiocyanate), in order to be able to quantified. The labeled antibody was subsequently applicated to the mouse by intratracheal instillation, whereby the amount of the applicated antibody that can be obtained by bronchoalveolar lavage (BAL) of the lungs was determined. Approximately 31 % of the total amount can be detected in BAL. On the basis of this results, it was possible to determinate, how much antibodies animals inhaled. It was found that the total amount of antibody which was applied by inhalation, only 0,31 % was obtained from the airways, specially 31 µg of antibody. This amount of specific antibody should be sufficient to give protection against PA adhesion to the lung surface.

Key words

cystic fibrosis, hen yolk antibodies, fluorescein isothiocyanate, bronchoalveolar lavage

Obsah

Seznam použitých zkratk.....	7
1 Teoretická část.....	8
1.1 Cystická fibróza	8
1.1.1 Obecná charakteristika CF.....	8
1.1.1.1 CFTR protein a důsledky jeho mutace	9
1.1.2 Projevy CF a příčiny jejich vzniku	11
1.1.3 Diagnostika onemocnění CF	13
1.1.4 Léčba a prevence CF	14
1.2 Dýchací ústrojí.....	16
1.3 Imunoglobuliny.....	17
1.3.1 Příprava protilátek	20
1.3.2 Slepíčí protilátky	21
1.3.2.1 Slepíčí protilátky a pasivní imunizace.....	22
2 Cíl práce	23
3 Experimentální část.....	24
3.1 Použitý materiál, pomůcky	24
3.1.1 Použité chemikálie.....	24
3.1.2 Použité přístroje.....	25
3.1.3 Pokusná zvířata.....	25
3.1.4 Ostatní pomůcky.....	25
3.2 Použité metody	26
3.2.1 Značení protilátky pomocí FITC	26
3.2.1.1 Stanovení koncentrace proteinu	26
3.2.1.2 Dialýza.....	26
3.2.1.3 Konjugace FITC s protilátkou	27
3.2.2 Intratracheální instilace	28
3.2.3 Inhalační experiment	31
4 Výsledky	35
4.1 Značení protilátky pomocí FITC	35
4.2 Intratracheální instilace.....	35
4.3 Inhalační experiment.....	37
5 Diskuze	39
6 Sourhn.....	41
7 Literární zdroje.....	42

Seznam použitých zkratk

ATP	adenosintrifosfát
BAL	bronchoalveolární laváž
BCR	receptor na povrchu B – lymfocytů
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CF	cystická fibróza
CFTR	„Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator“
C	konstantní doména imunoglobulinů
DMSO	dimethylsulfoxid
FITC	fluorescein isothiokyanát
H	těžký řetězec imunoglobulinů („Heavy“)
IgG	imunoglobulin třídy G
IgY	imunoglobulin Y (výskyt u ptáků)
L	lehký řetězec imunoglobulinů („Light“)
MSD	membránová doména („Membrane spanning domain“),
NBD	nukleotidová vazebná doména („Nucleotid binding domain“)
PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	„phosphate buffered saline“
PMN	polymorfonukleární neutrofily
PKA	proteinkinasa A
R – doména	regulační doména („Regulatory“)
RPM	počet otáček za minutu = „revolution per minute“
V	variabilní domény imunoglobulinů („Variable“)

1 Teoretická část

1.1 Cystická fibróza

1.1.1 Obecná charakteristika CF

Cystická fibróza je nevyléčitelné dědičné onemocnění, které je způsobeno genetickou mutací genu pro protein CFTR („Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“). Tato mutace způsobuje poruchu přenosu iontů (Cl^- , Na^+) a vody přes buněčnou membránu [1]. To způsobuje abnormálně hustý hlen a vytváří se predispozice k dýchacím infekcím, které vedou až ke smrti pacienta. Onemocnění cystická fibróza (CF) se projevuje opakovanými infekcemi dýchacích cest, které způsobují až chronické onemocnění. Dále také postižením trávicího traktu (střeva), pankreatickou nedostatečností a abnormální koncentrací chloridových iontů v potu. Právě díky abnormální koncentraci chloridových iontů je toto onemocnění nazýváno nemocí slaných dětí, a proto je základní diagnostikou potní test [2]. CF je komplexní onemocnění, ke kterému se přidávají i další komplikace, jako je cirhóza jater a diabetes. Hlavními příčinami nemoci a úmrtnosti nemocných jsou oportunní chronické plicní infekce způsobené *Pseudomonas aeruginosa* (PA), *Staphylococcus aureus* a *Burkholderia cepacia complex* [3].

Četnost tohoto onemocnění je u 1 dítěte z 2500 až 4500 novorozenců [4]. I přes pokroky v medicíně a vědecké zkoumání je tato nemoc stále nevyléčitelná, ale délka života pacientů se za posledních 30 let dramaticky zlepšila, přičemž průměrný věk přežití je přibližně 40 let [5].

Příčinou tohoto onemocnění je mutace genu *CFTR*, který je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu 7. Obsahuje 27 exonů a je dlouhý 250 kb [6]. Jeho nejčastější mutací je delece zbytku fenylalaninu v poloze 508, ale bylo identifikováno i dalších 2000 mutací [1]. Mutace tohoto genu se geneticky přenáší podle klasické mendelovské genetiky. Pokud jsou oba rodiče obligátní heterozygoti, znamená to, že jsou zdraví nositelé mutace genu a mají 25 % pravděpodobnost, že dítě bude nemocné, 50 % pravděpodobnost, že dítě bude zdravé, ale nositelem mutace genu nebo 25 % pravděpodobnost, že dítě bude zdravé a nebude ani nositelem mutace genu [4].

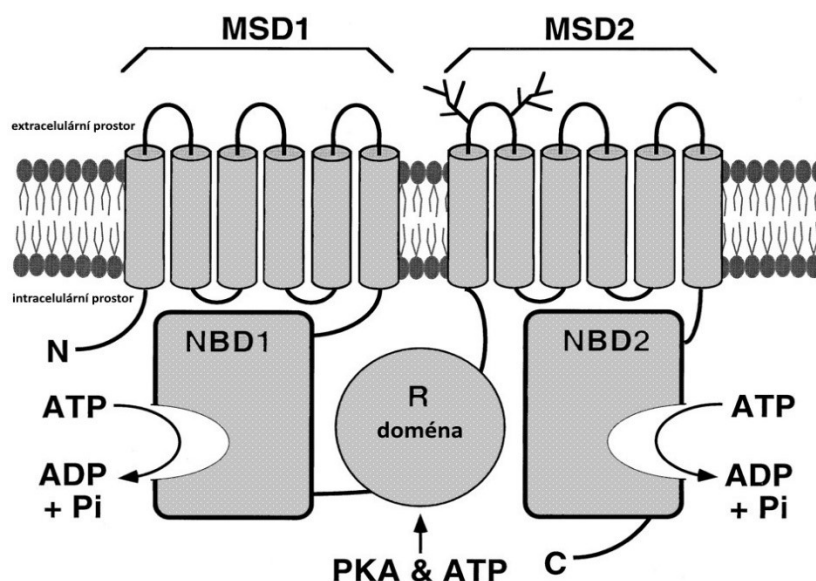
1.1.1.1 CFTR protein a důsledky jeho mutace

Protein CFTR patří do skupiny ABC transportérů, což znamená, že transportuje molekuly přes membránu za spotřeby ATP. Mezi přenášené molekuly patří například proteiny, ionty Cl^- , cytostatika, lipidy, aminokyseliny a disacharidy [4]. Funguje také jako regulátor dalších iontových kanálů a intracelulárních membránových transportních procesů [1].

CFTR je cAMP regulovaný chloridový kanál, který se nachází na apikální straně plazmatické membrány buněk sekrečních epitelů dýchacích cest, střeva, slinivky břišní, varlat a žláz s vnější sekrecí [7,8]. Skládá se celkem z 5 domén. Dvě domény jsou membránové domény (MSD 1, MSD 2 - „Membrane spanning domain“), dvě jsou nukleotidové vazebné domény (NBD 1, NBD 2 - „Nucleotid binding domain“) a jedna je regulační doména (R - „Regulatory“) [8].

CFTR patří mezi ATPasy, která je selektivní pro anionty a je regulována pomocí kinas, které aktivují kanál. Dochází k tomu fosforylací R domény pomocí cAMP – dependentní proteinkinasy A. Kanál se otevře, pokud je ATP navázané na NBD 1, a poté je hydrolyzováno. Následně mohou anionty proudit po směru elektrochemického gradientu přes póry, které jsou tvořeny transmembránovými doménami. Pokud je R doména defosforylována fosfatasou a ATP se nemůže vázat, kanály zůstanou zavřeny (viz. obr. 1, str. 10). Když je CFTR aktivováno cAMP, dochází k transportu Cl^- a k inhibici epiteliálního Na^+ kanálu a je tedy snižováno vstřebávání sodíkových iontů přes epitel [1, 3].

CFTR je také nezbytný pro reabsorpci chloridových iontů v potu. Reabsorpce chloridových iontů je řízena absorpcí Na^+ iontů přes sodné kanály, přítomných v apikální membráně potní žlázy. Pokud nefunguje nebo chybí CFTR tak k tomuto ději nedochází a tím se zvyšuje koncentrace chloridů v potu až pětinašobně [7].



Obr. 1: *Struktura CFTR*. PKA - proteinkinasa A. MSD1, MSD2 - transmembránové domény 1 a 2; NBD1 a NBD2 - nukleotidové vazebné domény 1 a 2; R doména - regulační doména. Převzato, upraveno [1].

Porucha CFTR, která je způsobená mutací genu pro tento protein, je příčinou závažných plicních onemocnění. Mutace, u nichž se předpokládá, že zapříčiní nejtěžší plicní onemocnění, jsou ty, které ovlivňují schopnost CFTR fungovat jako chloridový kanál, i jako regulátor vodivosti [3]. CFTR chloridové kanály v sekrečních epitelech plic zajišťují sekreci chloridových iontů a vody, což napomáhá k odstranění hlenu z dýchacích cest. Pokud dojde k mutaci, nastane porucha, pro níž je charakteristické abnormální vstřebávání sodíkových iontů, snížená sekrece a nedostatečné vstřebávání chloridových iontů [3, 9]. To vede k tomu, že hlen je více viskózní až tuhý a suchý. Takovýto hlen není snadné odstranit z dýchacích cest. Tyto změny způsobí dehydrataci povrchu dýchacích cest a vytvoří se vhodné prostředí pro usazování bakterií v dýchacích cestách a plicích. Dehydratace způsobí zhoustnutí a zpomalení pohybu hlenu. Hlen obalí řasinky a dojde k znesnadnění dopravy bakterií a cizorodých částic ven z plic. Začnou vznikat infekce a v plicích se shromažďují neutrofily, které vyvolávají produkci prozánětlivých cytokinů. Následně vzniknou chronické infekce a zánětlivé reakce, které v konečném důsledku poškozují dýchací cesty [10]. Z důvodu vyššího obsahu chloridových iontů v sekretech dýchacích cest u nemocných dochází ke změně iontové síly a mění se tím obranné mechanismy hostitele, především fagocytární bariéra, která je tvořena makrofágy a neutrofily. Také se deaktivují přirozeně vylučované

antibiotické peptidy, které jsou součástí primární ochrany plic proti bakteriálním infekcím [7].

Mutace genu *CFTR* velmi často ovlivňuje funkci pankreatu. Má za následek sníženou aktivitu CFTR, která způsobuje poruchu sekrece NaHCO_3 a vody. To vede ke snížení obsahu vody v pankreatických sekretech. Dochází k nízkému průtoku sekretů s vysokou koncentrací proteinu, který se vysráží a zapříčiní uzavření a fibrotizaci kanálků [11]. Nenastává neutralizace pH žaludeční tekutiny, a proto pankreatické enzymy nemohou pracovat v optimálním pH [7].

1.1.2 Projevy CF a příčiny jejich vzniku

Onemocnění cystická fibróza postihuje mnoho orgánů, ale především horní a dolní cesty dýchací. Dále zasahuje také slinivku, střeva, játra ale i mužské pohlavní ústrojí [6]. Více než 95 % mužů je neplodných z důvodu azoospermie a chybějícího chámovodu [12].

Největším zdravotním problémem pro pacienta s CF je chronická bakteriální infekce dýchacích cest způsobená bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a následný chronický zánět dýchacích cest.

Plicní onemocnění je nejčastější a hlavní příčinou nemoci a úmrtnosti u nemocných CF. Počáteční projevy jsou kašel, produkce sputa a dušnost [12]. Při často se opakujícím kašli dochází k přechodu na kašel chronický. Chronická infekce a zánět vedou k poškození tkáně dýchacích cest, kdy dochází k destrukci tkáně, která je způsobena lysosomálními enzymy uvolňovanými z neutrofilů. Pozdní komplikace zahrnují pneumotorax (vniknutí vzduchu do hrudníku, kdy dojde ke smrštění plic a zastavení jejich funkce) a vykašlávání krve z dolních cest dýchacích. Jedním z projevů je také bronchiektázie. Je to chronický zánět, který nakonec postupuje až k respiračnímu selhání [13].

Plíce pacientů jsou kolonizovány několika druhy patogenů. V raném dětství jsou často infikovány organismy jako *Staphylococcus aureus* a *Haemophilus influenza*, kdy dochází k poškození povrchu epitelu. Hlavní příčina chronické infekce je *Pseudomonas aeruginosa* a *Burkholderia cepacia* komplex [13].

Nemocní jsou nejvíce náchylní k infekci právě PA. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že se zvýší množství asialyzovaných proteoglykanů, a to vede k lepšímu přilnutí PA

pomocí lektinu PAIIL. Lektin PAIIL je bakteriální lektin s vysokou afinitou k L - fukose. Díky tomu se podílí na bakteriální adhesi na povrch epitelálních buněk dýchacích cest. Patří mezi významný virulenční faktor PA a účastní se tvorby biofilmu [14]. Infekce PA způsobuje pokles funkce plic a největší úmrtnost pacientů s CF. PA nejdříve kolonizuje dýchací dutiny a poté plice. Opakující se bakteriální infekce postupuje do chronické fáze, kdy bakterie tvoří biofilm [15]. Biofilm je společenstvo bakterií, které je zabudováno do polymerní matrice, která je tvořena polysacharidem podobným škrobu, bílkovinami a DNA. Tento polysacharid produkují samotné bakterie a tvoří se alginát, který drží bakterie pohromadě [16]. Biofilm způsobí odolnost bakterií, protože zvyšuje bakteriální rezistenci vůči fagocytům a antibiotikům [13]. Biofilm přitahuje a aktivuje polymorfonukleární neutrofil (PMN). PMN se začnou akumulovat a následně jsou zodpovědné za pokračující zánět. PMN produkují peptidasy, které ničí složky tkání, a proto při jejich dlouhodobé aktivaci při probíhajícím zánětu dochází k degradaci plicní tkáně. Vyvine se chronická infekce, která vede k poškození epitelu v dýchacích cestách. Při chronické infekci se také zhoršuje průchodnost plic a následně je i zhoršena jejich funkce. Vzhledem k schopnosti PA vyvinout rezistenci vůči mnoha používaným antibiotikům je nemožné zcela vymýtit tuto bakterii z plic pacienta CF [12].

Po plicích je u CF nejvíce ovlivněna slinivka břišní. Dochází k poruše v absorpci tuků, bílkovin a vitamínů rozpustných v tucích. Tato porucha má za následek nedostatečnou produkci pankreatických enzymů a projevuje se neprospíváním a podvýživou [13, 17]. Pacienti mohou trpět pankreatickou dostatečností nebo nedostatečností. Ti, kteří jsou pankreaticky nedostateční, špatně tráví a musí přijímat před jídlem suplementové enzymy. Je to z toho důvodu, že dochází ke snížené produkci lipasy. Enzymu, který vylučuje slinivka a který je zodpovědný za štěpení tuků. Jeho nedostatek má za následek poruchu vstřebávání tuku a steatorrhea. U pankreatické dostatečnosti je pankreat porušen, ale je stále dostatečná endogenní a exogenní funkce a stačí k udržení normálního trávení [11]. U starších pacientů dochází ke vzniku diabetu z důvodu destrukce pankreatu [13].

Projevy v gastrointestinálním traktu CF souvisejí se zahušťováním hlenu a zácpou. Může dojít až k ileus meconium, což je způsobeno sníženou sekrecí vody ve střevě [7].

Jaterní onemocnění se projevuje před nebo v průběhu dospívání. U dětí se může jaterní dysfunkce projevit jako cholestasa (porucha tvorby a vylučování žluče), která může vést až k jaterní cirhóze. U pacientů jsou pozorovány změny také ve žlučových cestách, které

se projevují přítomností žlučových kamenů a akutním zánětem žlučníku. Hromadění žluči ve žlučových cestách vede k hromadění toxických žlučových kyselin v játrech, vyčerpání jaterních antioxidantů a poškození jaterních buněk [18]. CF spojená s jaterním onemocněním probíhá ve třech fázích: steatóza jater, fokální biliární fibróza a multilobulární cirhóza. Steatóza jater se projevuje zvětšením jater a zvýšenou aktivitou transaminas. Je spojena s podvýživou, nedostatkem esenciálních mastných kyselin a oxidativním stresem. Fokální biliární fibróza je histopatologická léze jater, která je charakterizována zánětem a cholestasou. Cirhóza jater je už konečný a nevratný stupeň poškození, který vede k selhání orgánu [19].

1.1.3 Diagnostika onemocnění CF

Stanovení diagnózy se opírá o klinické příznaky, pozitivní rodinnou anamnézu nebo pozitivní novorozenecký screening. Kompletní diagnóza by měla zahrnovat potní test, molekulárně genetické vyšetření a vyšetření transepiteliálního rozdílu potenciálů [20].

Pro časnou diagnostiku se ihned po narození dítěte provádí novorozenecký screening, kdy se odebere kapka krve z patičky novorozence na filtrační papír ve věku mezi 72. až 96. hodinou života. Při narození dochází k uvolnění proteinů z pankreatu do krve a mezi tyto proteiny patří i imunoreaktivní trypsinogen, který se stanovuje při diagnostice CF screeningem. U nemocných CF je tento protein uvolňován ve větším množství než u zdravých lidí. Při vyšetření imunoreaktivního trypsinogenu se zjišťuje jeho koncentrace v krvi, která odhalí, jestli má novorozenec vyšší riziko onemocnění CF. Při zvýšené koncentraci trypsinogenu nastává zjišťování genetické mutace genu pro CF. Pokud je mutace nenalezena, vyšetření se opakuje z nově odebrané kapky krve. Pokud je mutace nalezena, následuje potní test a další metody vyšetření, které potvrdí nebo upřesní výsledky [20, 21].

Při klinických příznacích, které jsou typické pro CF musí být provedena daná vyšetření pro potvrzení této nemoci [13]. Klinickými příznaky jsou:

- Chronické sinobronchiální onemocnění – chronický kašel a produkce sputa, pískoty, přetrvávající infekce a kolonizace patogeny vyskytujícími se u pacientů s CF, trvalé abnormality na rentgenovém snímku plic a chronický zánět vedlejších nosních dutin.
- Gastrointestinální abnormality - postižení pankreatu (chronická pankreatitida), postižení střeva (syndrom distální střevní obstrukce, mekoniový ileus).
- Chronické onemocnění jater.
- Malnutrice – hubnutí, porucha růstu, steatorrhea, avitaminóza vitamínů rozpustných v tucích.
- Obstrukční azoospermie.
- syndrom ztráty solí – akutní ztráta solí, chronická metabolická alkalóza [20].

Koncentrace chloridových iontů v potu se vyšetřuje pomocí potního testu. Při tomto testu se stimuluje pocení pilokarpinovou iontoforézou. Normální hodnoty „chloridů“ jsou 10 – 30 mmol/l, hraniční hodnoty jsou 30 – 60 mmol/l. Hodnoty „chloridů“ nad 60 mmol/l ukazují na pozitivní test, který musí být ještě jednou zopakován, nejlépe v rozsahu několika týdnů [4, 23]. Koncentrace „chloridů“ v potu se s věkem zvyšuje, a proto musí být výsledky interpretovány s ohledem na věk [24].

Pro potvrzení diagnózy je nezbytné molekulárně genetické vyšetření, při kterém se vyšetřuje DNA izolovaná z leukocytů žilní krve. Při nálezů mutace obou alel genu CFTR je dané vyšetření pozitivní. V takovém případě by měli být vyšetřeni i další členové rodiny. V případě, že potní test a genetické vyšetření nepřinesou jednoznačný výsledek, použije se diagnostická metoda, kdy se měří odpověď rozdílu potenciálů na nosní nebo na rektální sliznici po aplikaci isoproterenolu nebo amiloridu. Normální hodnoty jsou 0 až -30 mV, u pacientů s CF je hodnota v rozmezí -34 až -60 mV. Zvýšená hodnota transepiteliálního rozdílu nosního potenciálu značí zvýšenou absorpci sodných iontů. [20, 22].

1.1.4 Léčba a prevence CF

U onemocnění CF je jediná možná ochrana prevence. I když na tuto nemoc není žádný lék, léčba se v posledních letech zlepšila. Léčba CF má za cíle kontrolovat plicní infekce, odstraňovat hlen z plic, zajistit dostatečnou výživu a zabránit nedostatku tekutin

v těle [4]. Nejčastější prevence u respiračního onemocnění je inhalace a léčebná rehabilitace [25].

Základní metodou je léčebná rehabilitace zahrnující respirační fyzioterapii a pohybovou terapii, které slouží k udržení průchodnosti dýchacích cest.

Respirační fyzioterapie obsahuje metody k odstranění hlenu. Nejčastějšími metodami, které pacienti provádí, jsou:

- Aktivní cyklus dechových technik – obsahuje tři samostatné techniky, které slouží ke zlepšení ventilačních parametrů a k usnadnění kontroly kašle a jeho časování.
- Autogenní drenáž – pacientem vědomě řízené modifikované dýchání, které slouží k odstranění hlenu z dýchacích cest.
- PEP systém dýchání – pozitivní výdechový přetlak zlepšuje konfiguraci hrudníku a obnovuje jeho fyziologické pohyby.
- Inhalační léčba – inhalace fyziologického hypertonického roztoku, mykolytik a amiloridu.
- Respirační handling – je to kombinace dechové a motorické stimulace pro prevenci vzniku špatných dechových vzorů.

Pohybová terapie se využívá k tomu, aby se zvýšila adaptace na tělesnou zátěž. Provádí se šestiminutový test chůze a „člunkový test“ nebo test formou „bicyklové ergometrie“. Z těchto testů se zjistí výsledky funkce plic a podle toho se vytvoří individuální pohybový program [4].

Inhalace slouží ke zředění a možnému odstranění hlenu z plic. Provádí se pomocí inhalátorů (nebulizátorů), které dopraví lék až na sliznici plic. Tento přístroj přemění roztok léku na suspenzi malých částic (aerosol), které se ukládají v různých částech plic [4]. Touto cestou se dostávají do plic různé léky, jako jsou antibiotika, mukolytika, bronchodilatační léky a inhalační fyziologický hypertonický roztok [25]. Používají se tryskové inhalátory, které rozprašují aerosol pomocí kompresorů. Vytváří se částice potřebné velikosti. Optimální velikost částic je aerodynamický průměr 2 – 5 μm . U inhalace je problém se správným dávkováním, a proto pacient musí dýchat pomalu a zhluboka, aby se dostalo co nejvíce částic do prostředí plic [4].

Léčebné postupy závisí na tom, v jaké fázi onemocnění pacienta je. U léčení infekce závisí léčba na místě a druhu infekce. Léčba klasického respiračního onemocnění se provádí pomocí očkování. Nemocní CF jsou očkováni podle běžného očkovacího kalendáře a navíc jsou očkováni pravidelně proti chřipce [4]. Pokud ale bakteriální infekce pokročí v chronickou infekci, dochází k zařazení do léčebných postupů inhalace léčiva (antibiotik). Při inhalaci se léčivo dostane přímo na místo infekce ve vysokých koncentracích. Neobjevují se vážné vedlejší účinky a zlepší se odstraňování bakterií. Bylo dokázáno, že nejúčinnější podání léku je 3x denně. Problémem je, že bakterie získávají rezistenci vůči antibiotikům, a proto je třeba hledat nové léčebné postupy [26].

1.2 Dýchací ústrojí

Dýchací ústrojí člověku umožňuje neustálou výměnu kyslíku a oxidu uhličitého procesem dýchání. Dýchací ústrojí se skládá z dýchacích cest a z plic. Dýchací cesty lze rozdělit na dolní a horní cesty dýchací. Dolní cesty dýchací se skládají z hrtanu, průdušnic, průdušek, průdušinek a plicních sklípků. K horním cestám dýchacím patří zevní nos, dutina nosní a nosohltan [27].

Plíce jsou hlavním orgánem, který zajišťuje výměnu kyslíku a oxidu uhličitého. Plíce jsou párový orgán, který se dělí na pravou a levou plíci. Do plic vstupují a vystupují cévy a nervy. Plíce jsou členěny na plicní laloky, kdy tři laloky tvoří pravou plíci a dva laloky levou plíci [28]. Plicní tkáň je složena z průdušek a plicních váčků. K vlastní výměně plynů dochází v plicních váčcích. Jejich stěny jsou vyklenuty v plicní sklípky – alveoly [28]. Plicní alveoly jsou váčky vystlané tenkou membránou a vrstvou řídkého hlenu, který usnadňuje dýchání. Při CF se tento hlen stane hustším a nemocnému se hůře dýchá.

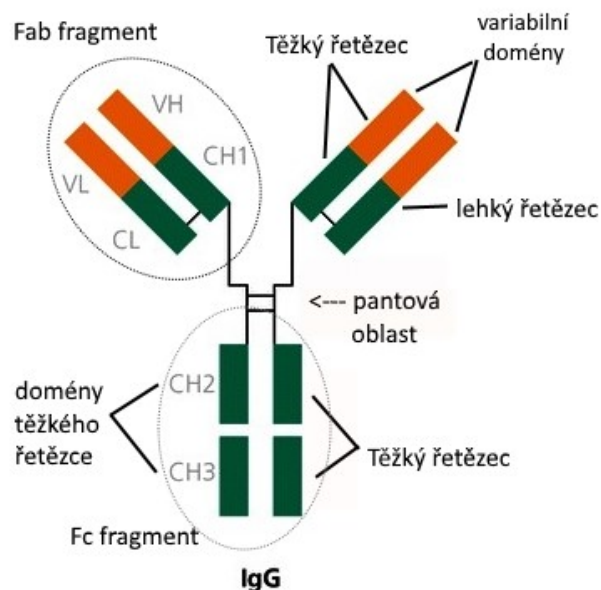
Stěna dýchacích cest je složena z několika vrstev. Mezi tyto vrstvy patří sliznice, slizniční vazivo, chrupavčitý podklad a hladká svalovina [27]. Povrch epitelu dýchacích cest je pokryt řasinkami a vrstvou hlenu, která lemuje lumen dýchacích cest. Řasinky zachytávají nečistoty a tvoří stálý proud, který pohybuje hlenem k nosohltanu. Tímto pohybem jsou nežádoucí částice a mikroorganismy dostávány ven z dýchacích cest. Hlen se skládá ze 2 vrstev. Vrchní vrstva je viskózní a zachycuje částice a mikroorganismy. Spodní vrstva je tekutější a pohybují s ní řasinky [13].

Zdravé dolní dýchací cesty jsou udržovány ve sterilním stavu díky vrozené obraně hostitele. Tato obrana se skládá z fyzických, fagocytujících a chemických bariér. Naopak horní cesty dýchací jsou kolonizovány širokou škálou mikroorganismů [13].

K vrozené obraně hostitele v plicích patří tenká vrstva tekutiny, která je pokrývá. Tato tekutina zvlhčuje povrch dýchacích cest. Skládá se ze dvou složek z vrstvy periciliární tekutiny a vrstvy hlenu. Periciliární tekutina obsahuje antioxidanty, antibiotika, proteasy, oxidanty a protilátky, které spolupracují při inaktivaci a zničení patogenů bez vedlejšího poškození plic. Plicní obrana je podporována kašlem, kdy dochází k mechanickému čištění plic. Je navíc doplněna o buněčné imunitní mechanismy, které zahrnují dendritické buňky, neutrofilů a makrofágy [11].

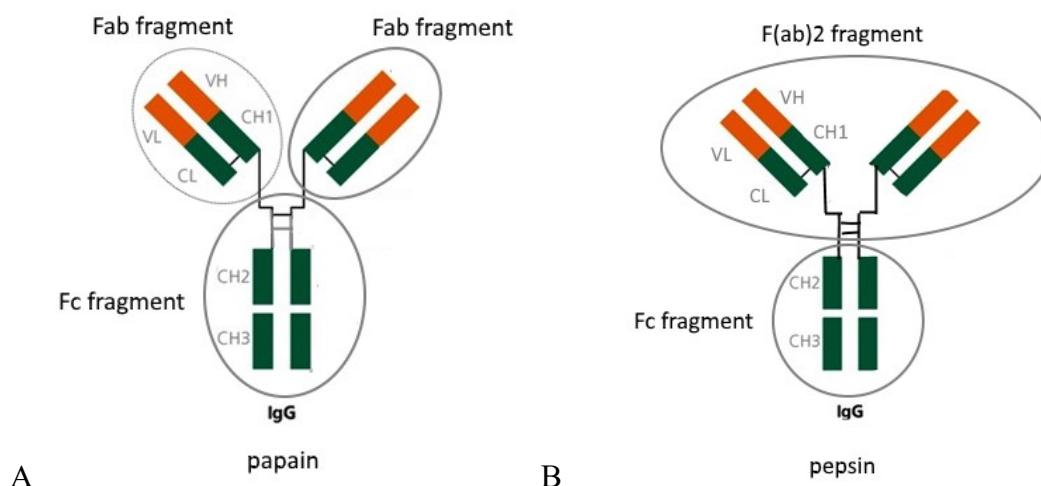
1.3 Imunoglobuliny

Savčí protilátky jsou produkovány B - lymfocyty, respektive plazmatickými buňkami. Plazmatické buňky jsou konečné diferencí stadium B - lymfocytů. Molekuly protilátek jsou obvykle připodobňovány tvaru Y a skládají se ze 2 těžkých (značí se H; „Heavy“) a 2 lehkých (značí se L; „Light“) polypeptidových řetězců. Těžké řetězce jsou kovalentně spojeny disulfidickými můstky. Místo, kde k tomuto spojení dochází se nazývá pantová oblast. Také každý lehký řetězec je připojen k těžkému řetězci disulfidovými můstky. V dané molekule imunoglobulinu jsou oba těžké a lehké řetězce shodné. Mají tedy dvě identická vazebná místa pro antigen. Jsou dva typy lehkých řetězců lambda (λ) a kappa (κ) [29]. Tyto typy lehkých řetězců se liší primární strukturou konstantních domén, které jsou kódovány odlišnými geny [30]. Těžký řetězec existují v pěti různých izotypech μ , δ , γ , α a ϵ , které určují funkční aktivitu protilátky [29]. Těžké i lehké řetězce se skládají z variabilních a konstantních domén. Variabilní domény, které se označují V_H a V_L , odpovídají první doméně těžkého a lehkého řetězce na N - konci a je na nich místo pro vazbu specifického antigenu. Zbytek řetězce tvoří konstantní domény, které se označují C_L , C_{H1} , C_{H2} a C_{H3} . Těžký řetězec má zpravidla domény čtyři (V_H , C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) a lehký domény dvě (V_L , C_L) (viz obr. 2, str. 18) [29]. Vazebné místo protilátky, přes které dochází k vazbě antigenu, se nazývá paratop. Místo pro vazbu protilátky na antigen se nazývá epitop. Při interakci protilátka – antigen se především uplatňují vazby iontové, hydrofobní, vodíkové můstky a van der Waalsovy interakce [31].



Obr. 2: *Struktura protilátky*. V_L a C_L jsou domény lehkého řetězce. V_H , C_{H1} , C_{H2} a C_{H3} jsou domény těžkého řetězce. V_L a V_H jsou variabilní domény s místem pro vazbu antigenu. Pantová oblast spojuje těžké řetězce disulfidickými můstky. Převzato, upraveno [32].

Proteolytické enzymy štěpí molekuly protilátky. Například proteolytický enzym papain štěpí protilátky na tři fragmenty: dva Fab fragmenty vázající antigen a jeden Fc fragment [29]. Pepsin naopak štěpí protilátku na Fc fragment a jeden dimerní $F(ab)_2$ fragment (viz obr. 3, str. 19) [31]. Fab fragmenty se skládají z kompletního lehkého řetězce a V_H , C_{H1} domény těžkého řetězce [29]. Pantová oblast udržuje určitou flexibilitu Fab fragmentům imunoglobulinu [30]. Ty mohou být dále rozděleny na různé F_v fragmenty složeny z variabilní domény lehkého a těžkého řetězce a na F_b fragment skládající se z C_L a C_{H1} . Fc fragment odpovídá spárovaným C_{H2} a C_{H3} doménám a spolupracuje s efektorovými molekulami a buňkami [29]. Zprostředkovává efektorové funkce vazbou na Fc receptor na efektorových buňkách nebo aktivuje jiné imunitní mediátory, jako je například komplement [31].



Obr. 3: Štěpení protilátky IgG enzymy na fragmenty. (A) Štěpení papainem. (B) Štěpení pepsinem. V_L a C_L jsou domény lehkého řetězce. V_H , C_H1 , C_H2 a C_H3 jsou domény těžkého řetězce. V_L a V_H jsou variabilní domény. Převzato, upraveno [32].

Protilátky se dělí do pěti různých tříd imunoglobulinů – IgM, IgD, IgG, IgA a IgE. IgG mohou být dále rozděleny do 4 podtříd, IgG1, IgG2, IgG3 a IgG4. Každá podtřída má vlastní biologické vlastnosti. Během vývoje B – buněk jsou první vytvořené protilátky IgM. IgM a IgE obsahují navíc jednu konstantní doménu C_H4 . IgM účinně aktivují klasickou dráhu komplementu. Při zrání na sebe navazují jednotlivé molekuly IgM, které se spojují disulfidickými vazbami a vytváří pentamer, který obsahuje polypeptidový řetězec, který je nazýván J – řetězec a je připojen ke dvěma monomerům také disulfidovou vazbou [31]. Tento řetězec usnadňuje vylučování na povrchu sliznic. Stejně jako IgM i IgA obsahuje J – řetězec, který spojuje dimer IgA. IgA jsou sekretované na povrchu sliznic a obsahují kromě J – řetězce navíc i sekreční komponentu. Sekreční komponenta se nachází v membráně epitelálních buněk pod povrchem sliznice. IgA se na ni naváže a spolu s ní prochází na povrch sliznice a uvolňuje se do sekretu. Sekreční komponenta chrání IgA v sekretu proti poškození proteolytickými enzymy. Uplatňují se při ochraně proti mikroorganismům, protože brání jejich adhezi na slizniční povrch. Monomerní IgM a IgD se nachází na povrchu B buněk a tvoří receptor lymfocytů B (BCR). IgE se nejvíce využívají při obranných reakcích proti mnohobuněčným organismům na sliznicích a jsou hlavní příčinou alergické reakce [30, 33].

1.3.1 Příprava protilátek

Z hlediska přípravy se protilátky dělí na monoklonální a polyklonální. Monoklonální protilátky jsou vyrobeny jedním klonem plazmatických buněk. Všechny se váží na stejný epitop antigenu a jsou jednoho izotypu [34]. Nejčastější způsob přípravy je hybridomová technologie [35].

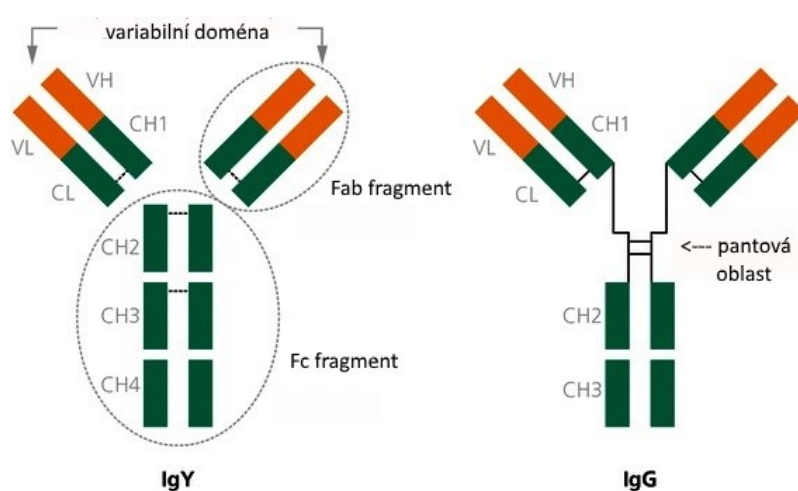
Monoklonální protilátky se vyskytují v těle jen v malé míře a *in vitro* je lze připravit izolací klonů B – lymfocytů, které produkují potřebné protilátky dané specifity, které se po izolaci pěstují v buněčné kultuře. Jelikož mají B - lymfocyty krátkou dobu života, je třeba zajistit jejich nesmrtelnost, která se nejčastěji navodí fúzí s myelomovou buněčnou linií, která velmi dobře roste ve tkáňové kultuře. Fúzí právě B - lymfocytů a myelomových buněk vzniká hybridom. Hybridom je buňka, která produkuje stejné protilátky jako specifický B - lymfocyt. Takto vyrobené protilátky se využívají v biologickém výzkumu a slouží i jako diagnostika a terapeutika. Jsou to klíčové molekuly v celé řadě klinických diagnostických testů [30].

Nejčastěji se získávají myší monoklonální protilátky. První fází je imunizace, při které se indukují imunitní odpověď na podaný antigen. Většinou se spolu s antigenem používá pomocná látka - adjuvans, která zesiluje imunitní odpověď na antigen například tím, že se prodlouží přítomnost antigenu v krvi nebo napomáhá interakci antigenu s buňkami prezentujícími antigen. K procesu hybridizace dochází nejčastěji fúzí myších slezinných B - buněk s myelomovými buňkami. Po vzniku hybridomů se musí vybrat ty, které produkují specifické protilátky [35].

Polyklonální protilátky na rozdíl od monoklonálních se váží na více epitopů a jsou tvořeny řadou klonů plazmatických buněk. Polyklonální protilátky se připravují imunizací experimentálního zvířete, ze kterého se získá polyklonální antisérum, které reaguje s mnoha epitopy na určitém antigenu [30]. Ve srovnání s monoklonálními protilátkami je příprava těchto protilátek finančně nenáročná a jednoduchá. Pokud se k imunizaci použije větší zvíře, lze získat velké množství antiséra bohatého na protilátky (od králíka například 60 ml) [35]. Nejčastěji používaný druh je králík, který produkuje protilátky s vhodnými titry. Výhodou také je, že se snadno chovají a je s nimi snadná manipulace [34].

1.3.2 Slepíčí protilátky

Slepíčí protilátky jsou získávány z vaječných žloutků. Podobně jako savčí imunoglobuliny mají dva těžké a dva lehké řetězce. Těžký řetězec má jednu variabilní a 4 konstantní domény [36]. Tyto protilátky jsou velmi podobné savčím IgG, ale na rozdíl od nich neaktivují savčí komplement. To je důvod, proč při vazbě na antigen nevyvolávají zánětlivou reakci. Také neinteragují s Fc receptory savců a s proteinem A a G nebo revmatoidním faktorem. Liší se také ve struktuře, kdy molekulová hmotnost těžkého řetězce IgY je 67 až 70 kDa a savců je 50 kDa. IgY je hydrofobnější a má méně flexibilní řetězec než IgG. Tento rozdíl je způsoben jednou konstantní doménou těžkého řetězce, která je u IgY navíc oproti IgG. To vede ke zkrácení pantové oblasti. IgY má navíc také sacharidový řetězec (viz obr. 4) [37].



Obr. 4: Porovnání struktury slepičí a savčí protilátky. Obě molekuly mají dva těžké a dva lehké řetězce, které zahrnují variabilní domény (V_L a V_H). Těžký řetězec IgG má tři konstantní domény (C_{H1} , C_{H2} a C_{H3}). Těžký řetězec IgY má navíc konstantní doménu C_{H4} . C_L je konstantní doména lehkého řetězce. Převzato, upraveno [32].

Použití slepic pro produkci protilátek má mnoho výhod oproti imunizaci savců. Největší výhodou je, že slepice produkují protilátky do žloutku vajec. Sběr vajec je neinvazivní ve srovnání se stresujícím získáváním krevního séra zvířat. Kromě toho dlouhotrvající titr protilátek ve slepici snižuje potřebu reimunizace [38]. Tvorba protilátek proti vysoce konzervovaným savčím proteinům je úspěšnější u kuřat než u jiných savců vzhledem k jejich fylogenetické odlišnosti. Navíc v případě slepic pro vyvolání dostatečné

imunitní reakce stačí mnohem méně antigenu [37]. Slepice jsou schopné za rok vyprodukovat více než 22,5 g IgY a z toho mezi 2 – 10 % jsou specifické protilátky [38]. Také náklady na chov nosnic je nižší než u savců. Celkově lze říci, že získání slepičí protilátky je neinvazivní, rychlé a ekonomicky výhodné [37].

1.3.2.1 Slepičí protilátky a pasivní imunizace

Protilátky jsou používány již po více než století v prevenci a léčení širokého spektra infekčních onemocnění. Využívají se pro pasivní imunizaci. Je možné je využít i jako profylaxy. Pasivní imunizace je postup, kdy jsou podány protilátky z vnějšího zdroje s cílem zabránit infekčním onemocněním [39]. Jedná se tedy o alternativu k používání antibiotik. V poslední době je snaha nahradit antibiotika jinými léčivy jako například slepičími protilátkami. Je to důsledek toho, že bakterie získávají rezistenci na antibiotika a ta pak ztrácí svoji účinnost [40].

IgY proti PA mohou omezit počáteční kolonizaci dýchacích cest. Je prokázáno, že tyto protilátky snižují bakteriální infekci. Jejich účinek je takový, že snižují možnost kolonizace bakterií a okamžitě usnadňují bakteriální clearance [15]. Také inhibují mikrobiální adheze na povrchu epiteliálních buněk [41]. Pomocí IgY proti lektinu PAIIL se zvýší eliminace bakterií zprostředkovaná fagocytózou. Pomocí opsonizace se vyvolá zvýšení hydrofobicity povrchu buněk bakterií, díky níž se snižuje adheze na povrch epitelu plic a zvyšuje se adheze k fagocytujícím buňkám. IgY také indukují tvorbu agregátů bakterií. Díky těmto skutečnostem je usnadněna fagocytóza bakterií zprostředkovaná PMN a dochází k následné eliminaci bakterií [12].

2 Cíl práce

Cílem této práce bylo pokračovat ve vývoji experimentálního savčího modelu pro onemocnění cystická fibróza a možnosti léčby a ochrany před infekcí pomocí pasivní imunizace slepičími protilátkami. Hlavním úkolem bylo zjistit, jaké množství slepičí protilátky je experimentální zvíře schopno nainhalovat.

Pro splnění hlavního cíle bylo třeba splnit tyto jednotlivé úkoly:

- označit protilátku pomocí FITC
- zjistit množství protilátky aplikované intratracheální instilací
- zjistit celkové množství protilátky v plicích při inhalaci

3 Experimentální část

3.1 Použitý materiál, pomůcky

3.1.1 Použité chemikálie

Fluka (Německo)

- azid sodný

Lach-ner (Česká republika)

- chlorid sodný; dihydrogenuhličitan sodný dihydrát

Penta (Česká republika)

- hydrogenuhličitan sodný; hydroxid sodný

Sigma (USA)

- dimethylsulfoxid; fluorescein isothiokyanát; ethanolamin

Ostatní:

- Deionizovaná voda
- Mesocain gel 200 mg/ml (Zentiva)

3.1.2 Použité přístroje

analytické váhy	OHAUS (USA)
centrifuga Eppendorf 5418	Eppendorf (USA)
magnetická míchačka RH Basic 2	IKA (USA)
pH metr HI 2211	HANNA instruments (USA)
předvážky EW 600	KERN (Česká republika)
spektrofluorimetr Tecan Infinite M200 PRO s programem i-control 1.8	Tecan (Švýcarsko)
spektrofotometr Cary 60	Agilent Technologies (USA)
topná deska	P-Lab a. s. (Česká republika)
třepačka Mini-rocker	Biosan (Lotyšsko)
světlovod KL 200	Schott (Německo)

3.1.3 Pokusná zvířata

Velaz (Česká republika)

- myši - kmen ICR CD1, samci

3.1.4 Ostatní pomůcky

destičky černé CellBind® 96 jamek	Corning (USA)
dialyzační trubice	Novagen (USA)
intravenosní kanyly	Terumo (Japonsko)
injekční stříkačky	B. Braun (Česká republika)

3.2 Použité metody

V této práci byly použity kontrolní protilátky z neimunizované slepice. Pro použití byl vybrán vzorek protilátky s vyšší koncentrací 13,46 mg/ml proteinu, která byla před značením pomocí FITC spektrofotometricky stanovena.

3.2.1 Značení protilátky pomocí FITC

Protilátky byly značeny pomocí FITC (fluorescein isothiokyanát), což je poměrně malá fluoreskující molekula, kterou je možno navázat na amino skupiny proteinů. Toto značení bylo provedeno proto, aby bylo možné kvantifikovat množství protilátky v plicích.

3.2.1.1 Stanovení koncentrace proteinu

Použité chemikálie:

- PBS s azidem, 0,1 % (w/v) NaN_3 ;
- Roztoky preimunních protilátek

Vybrané protilátky byly pro měření 51x naředěny. Do křemenné kyvety bylo pipetováno 50 μl protilátky a 2,5 ml PBS s azidem. Měření probíhalo na spektrofotometru Carry 60 ve křemenné kyvetě při 280 nm. Jako srovnávací roztok bylo použito PBS s azidem. Z naměřených hodnot absorbance byly vypočítány koncentrace proteinu daných protilátek.

Pro výpočet koncentrace byl použit následující vztah:

$$A_{280} \cdot 1,094 = c \text{ mg/ml},$$

kdy A_{280} odpovídá absorbanci při 280 nm; c výsledné koncentraci, 1,094 optické denzité pro koncentraci 1 mg/ml.

3.2.1.2 Dialýza

Protilátka byla uchovávána v PBS s 0,1 % azidem. Azid se k roztoku protilátky přidává z důvodu ochrany před degradací mikroorganismy při dlouhodobém skladování. S ohledem na další průběh experimentu bylo nutné azid dialýzou odstranit.

Dialýza je metoda, při které dochází k oddělení molekul různých velikostí. Využívá se k tomu membrán, které mají různé velikosti pórů podle toho, jak velké molekuly mají být zadrženy.

Použité chemikálie:

- Roztok preimunní protilátky
- Uhličitanový pufr – 30 mM Na₂CO₃, 100 mM NaHCO₃, 150 mM NaCl, pH = 9,5 (upraveno pomocí 2 M roztoku NaOH)
- PBS pufr – 50 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH = 7,2 (upraveno pomocí 2 M roztoku NaOH)

Pracovní postup:

Roztok protilátky o objemu 5 ml byl dialyzován v uhličitanovém pufru. Protilátka byla odměřena do dialyzační trubice. Dialyzační trubice byla před aplikací protilátky značené FITC namočena 10 minut v deionizované vodě. Dialýza probíhala v desetilitrové nádobě s připraveným pufrem za mírného míchání na magnetické míchačce a v chladu při 7 °C. Tato dialýza probíhala celkem 20 hodin a pufr byl vyměněn jednou po 6 hodinách.

3.2.1.3 Konjugace FITC s protilátkou

Použité chemikálie:

- FITC
- Dimethylsulfoxid
- Ethanolamin: 99 % kapalina; 1,016 g · cm⁻³; 10 mg/ml

Postup:

Po dialýze v uhličitanovém pufru byla přeměřena koncentrace protilátky. Pro měření byla protilátka 51x naředěna uhličitanovým pufrem (viz. kap. 3.2.1.1).

Pro konjugaci protilátky s FITC byl připraven roztok FITC v DMSO o koncentraci 10 mg/ml. Tento roztok byl přidán k protilátce v poměru 1:1 ve 3 přidavcích. Konjugace probíhala 2 hodiny ve skleněné lahvičce obalené alobalem za stálého mírného míchání v chladu. Pro ukončení konjugace byl přidán ethanolamin v padesátinásobném molárním

přebytku oproti FITC. Roztok ethanolaminu byl připraven ze zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/ml, který byl 10x naředěn uhličitanovým pufrům.

Po přidání FITC k protilátce probíhala další dialýza, aby došlo k oddialyzování nenavázaného FITC. Tato dialýza probíhala v PBS, který byl připraven navážením $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a NaCl a následným rozpuštěním ve 3 l deionizované vody. Dialýza probíhala v chladicí místnosti v 7 °C a při mírném míchání v PBS na magnetické míchačce. Pufr byl vyměňován 4x. Po 3, 15, 7 a 11 hodinách.

Po dialýze v PBS byl objem protilátky 5 ml. Byla stanovena koncentrace proteinu v konjugátu a byl určen molární poměr F / P. K tomuto stanovení bylo třeba nejdříve změřit absorbanci konjugátu při vlnových délkách 280 a 494 nm. Jako srovnávací roztok bylo použito PBS. Roztok konjugátu byl pro měření 51x naředěn PBS.

Pro výpočet koncentrace proteinu v konjugátu byl použit vzorec

$$c_{konj.} = \frac{[A_{280} - (CF \cdot A_{494})]}{1,094},$$

kde CF je korekční faktor - příspěvek FITC k naměřené absorbanci při 280 nm udaný jako násobek absorbance při 494 nm (0,35); $c_{konj.}$ je koncentrace proteinu v konjugátu.

Molární poměr FITC a proteinu F/P byl určen pomocí vzorce

$$F/P = \frac{A_{494}}{68000} \cdot \frac{Mr_{proteinu}}{c_{konj.}},$$

kde $68000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ je extinkční koeficient pro fluorescein, $Mr_{proteinu}$ je relativní molekulová hmotnost proteinu. Tento poměr určuje míru značení.

3.2.2 Intratracheální instilace

Aplikace protilátky značené FITC neinvazivní intratracheální instilací byla provedena ke zjištění přibližného množství protilátky, které je možné získat z dýchacích cest pomocí bronchoalveolární laváže (BAL). Při této metodě se protilátka dostane přímo do plic, kde je distribuována po celém jejich povrchu. V tomto experimentu byli použiti samci myši kmene ICR CD1.

Použitá zvířata:

- Samci, kmen ICR CD1 – rozmezí 32 – 36 g

Použitá chemikálie:

- PBS s azidem (0,1 % (w/v) NaN_3 ; 100 mM NaCl; 25 mM Na_2HPO_4)
- Protilátka značená FITC

Použitá anestezie:

- Směs komerčních roztoků ketaminu a xylazinu v poměru 1:1
- Mesocain (Zentiva) – gel

Postup:

Pro experiment bylo použito 6 pokusných zvířat. Myši bylo aplikováno 100 μl směsi anestetik do vnitřního svalu stehna. Po uspání byla myš zachycena za horní zuby na aplikační destičku tak, aby hlava byla v záklonu a přední nohy směřovaly směrem dopředu (viz obr. 5, str.30). Na pinzetu byla předem připravena smyčka z nitě pro přichycení jazyka. Pinzetou byl vytažen jazyk na levou stranu a uvázán provázek, za který byl při aplikaci přidržován jazyk. Jazyk byl takto přidržován proto, aby byla dobře zpřístupněna trachea pro aplikaci protilátky. Světlovod (Schott), se zdrojem studeného světla byl nastaven tak, aby bylo vidět otevírání hlasivek při dýchání. Špička kanyly byla před aplikací potřena malým množstvím lokálního anestetika, aby nedošlo k otoku hlasivek. Do ústí kanyly bylo aplikováno 30 μl protilátky značené FITC o koncentraci 8,21 mg/ml. Kanyla byla s opatrností zavedena do trachee. Při správné aplikaci myš roztok z kanyly nadechla. Po nadechnutí bylo aplikováno přes kanylu pomocí plastové stříkačky 200 μl vzduchu, pro zajištění úplné aplikace protilátky do plic a správnou distribuci v nich. Poté byla vyjmuta kanyla a byla stažena nit z jazyku myši. Vatovou tyčinkou namočenou ve vodě byl navlhčen jazyk. Myš byla ponechána v krabici na topné desce při 35 °C po dobu 10 minut, aby nedošlo k podchlazení.



Obr. 5: *Uspořádání při intratracheální instilaci.*

Získání experimentálního materiálu:

Myš byla před usmrcením ponechána 10 minut na topné desce, aby proběhla lepší distribuce protilátky v plicích pomocí dýchání. Usmrcení bylo provedeno stržením vazy. Po usmrcení byly ihned vyjmuty plíce.

Myš byla položena na polystyrenovou destičku a pomocí špendlíků připevněna za přední a dolní končetiny. K následnému lepšímu odhalení trachey byla připevněna i za tváře. Došlo k odstranění kůže a nastřížení svaloviny. Musel být rozstříhnut hrudní koš, aby se odhalily plíce a srdce. Následně bylo odstraněno srdce s brzlíkem. Poté následovalo odhalení trachey odstraněním svaloviny, kterou je obklopena. Pod tracheu byla vložena úzká špičatá pinzeta. Trachea byla nastřížena mezi dvěma chrupavkami. Do vzniklého malého otvoru byla zastrčena kanyla s olivkou. Olivka s tracheí byla podvázána nití. Následně byly plíce opatrně vyjmuty, aby nedošlo k jejich poškození.

Po vyjmutí plic byla provedena bronchoalveolární laváž (BAL). BAL je vhodná pro získání buněčného i nebuněčného obsahu z dolních cest dýchacích a alveolů. Laváží byla značená protilátka FITC vypláchnuta z plic. Vypitvané plíce byly pověšeny za kanylu s olivkou na aparaturu pro BAL. Tato aparatura byla složena ze stojanu, držáku na byrety a skleněné stříkačky. Kanyla s olivkou a s vypreparovanými plícemi byla připevněna ke skleněné stříkačce. Do stříkačky bylo odměřeno 500 μ l PBS s azidem a aplikováno do plic. Z plic bylo PBS s azidem odsáto a opět naplněno, ale tentokrát 400 μ l PBS s azidem. Opakovaným postupem byla získána druhá laváž. Vzorky laváží byly uschovány pro stanovení obsahu protilátky značené FITC. Tento postup byl praktikován u všech plic.

Stanovení fluorescence protilátky ve vzorcích:

U vzorků, které byly získány BAL, byl určen jejich objem vážením. Pro odstranění buněk a hlenu z plic, které by mohly bránit fluorescenci při měření, byly všechny vzorky centrifugovány. Centrifugace probíhala při otáčkách 13200 RPM po dobu 3 minut v centrifuze (Eppendorf 5418) s úhlovým rotorem, který má 18 pozic o průměru 11 mm pro mikrozkušavky objemů 1,5 / 2,0 ml. Supernatant byl přenesen do čistých mikrozkušavek.

Před měřením lavází po centrifugaci bylo třeba si připravit kalibrační roztoky pro sestavení kalibrační křivky. Ze zásobního roztoku konjugátu o koncentraci 8,21 mg/ml byl připraven roztok A o koncentraci 0,6 mg/ml naředěním pomocí PBS s azidem. Z roztoku A byly postupně připravovány další roztoky o koncentracích 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125 mg/ml ředěním opět PBS s azidem.

Vzorky před měřením byly upravovány tak, že první laváže po centrifugaci byly ředěny PBS s azidem v poměru 1:1. Opakované laváže už ředěny nebyly. Takto připravené roztoky byly přeneseny do černé 96 jamkové destičky (Corning). Od každého vzorku byly naplněny 3 jamky po 100 μ l. Jako srovnávací roztok byl použit PBS s azidem.

Fluorescence byla měřena na spektrofluorimetru Tecan Infinite. Nastavení pro měření bylo 494 nm excitační vlnové délky a emisní vlnové délky 518 nm. Zesílení („gain“) bylo nastaveno na hodnotu 53. Mód měření byl nastaven shora a bez víčka.

3.2.3 Inhalační experiment

Při tomto experimentu byla využita inhalační aparatura, která byla optimalizována již při předešlých experimentech [41]. Pokud myši inhalují společně, musí být od sebe odděleny přihrádkami, aby nedošlo k jejich vzájemnému poranění. Tento experiment sloužil k tomu, aby bylo možno zjistit přibližné množství protilátky inhalované do plic.

Použitá zvířata:

- Samci, kmen ICR CD1 – rozmezí 32 – 36 g

Použité chemikálie:

- PBS s azidem (0,1 % (w/v) NaN_3 ; 100 mM NaCl; 25 mM Na_2HPO_4)
- Protilátka značená FITC

Použitá anestetika:

- Směs komerčních roztoků ketaminu a xylazinu v poměru 1:1

Použité přístroje:

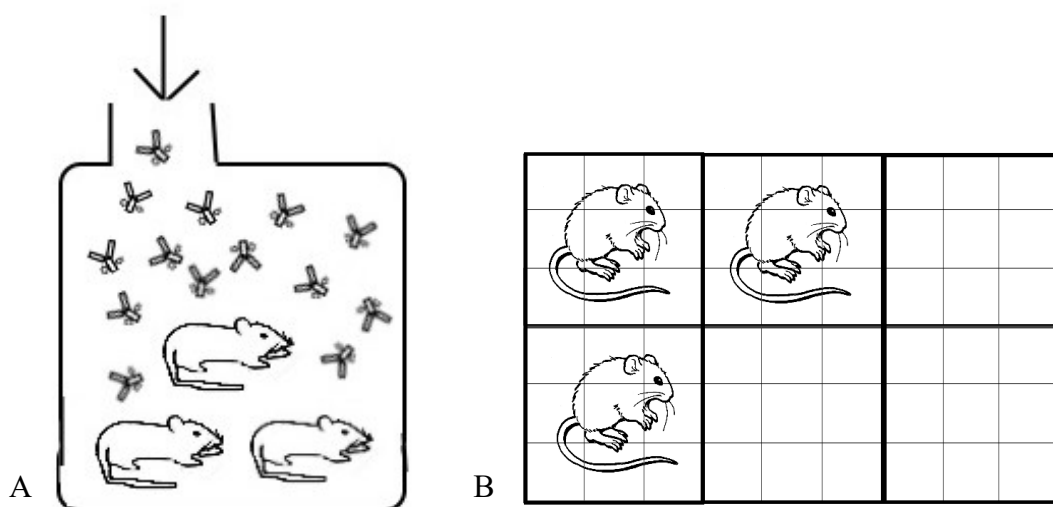
- Nebulizér Pari Boy
- Plastové 0,5 l lahve
- Plastová nádoba (kanystr) 5 l

Pracovní postup:

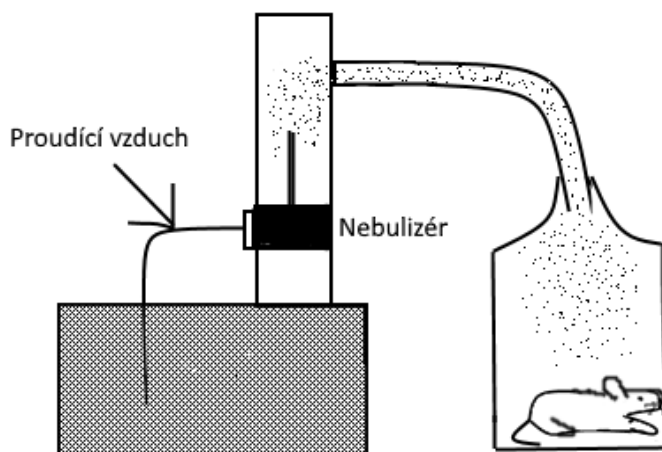
Pro inhalaci bylo použito 6 samců myši. Nejdříve byla sestavena inhalační aparatura, která se skládala z kompresoru, nebulizéru, hadice, nádoby, plastových lahví a mřížky. Do nebulizéru bylo přeneseno 2 ml protilátky o koncentraci 5 mg/ml, která byla připravena ze zásobního roztoku o koncentraci 8,21 mg/ml přidáním 2,9 ml PBS k 4,5 ml protilátky. Průtoková rychlost protilátky v nebulizéru byla 0,2 ml / min a doba expozice ve skupině byla 10 minut.

Pro tento experiment byly zvoleny dvě varianty uspořádání. Zaprvé byly tři myši dány jednotlivě do plastových lahví a společně vloženy do plastové nádoby, kde byly překryty mřížkou bránící útěku. Zvířata byla od sebe oddělena plastovými lahvemi, aby nedošlo k jejich vzájemnému poranění. Tyto tři myši dýchaly aerosol daného množství protilátky společně (viz obr. 6, str. 33). Aerosol byl ke zvířatům přiváděn pomocí plastové hadice a kanystr byl utěsněn samolepící páskou, aby nedošlo k úniku aerosolu.

Za druhé tři myši inhalovaly individuálně (viz. obr.7, str. 33). Každé zvíře bylo samostatně v plastové lahvi, do které byla zanořena trubice přivádějící aerosol. Hrdlo lahve bylo opět utěsněno lepící páskou, aby nedocházelo k úniku aerosolu. Myši byly postupně exponovány aerosolu protilátky 10 minut. Po usnutí 100 µl anestetik byla zvířata stržením vazy usmrcena a bylo provedeno vyjmutí plic stejným postupem jako u intratracheální instilace.



Obr. 6: *Uspořádání inhalačního experimentu ve skupině. (A) Aerosol slepičí protilátky značené FITC přiváděn ze shora otvorem do nádoby. (B) Uspořádání myši při pohledu do nádoby.*



Obr. 7: *Inhalační aparatura při inhalaci protilátky značené FITC jednotlivci.*

Získání experimentálního materiálu:

Po vyjmutí plic byla provedena BAL nejdříve 500 μ l a poté 400 μ l PBS s azidem. Byly tedy získány dvě laváže z každého zvířete. Získané vzorky z laváží byly zpracovány stejným způsobem jako u experimentu intratracheální instilaci (viz kap. 3.2).

Stanovení fluorescence protilátky ve vzorcích:

Pro tento experiment bylo třeba vytvořit kalibrační křivku v rozsahu koncentrací 0,05 až 0,005 mg / ml. Roztok o koncentraci 0,05 mg/ml byl připraven ředěním ze zásobního roztoku značené protilátky o koncentraci 8,21 mg/ml. Ředění bylo prováděno pufrům PBS s azidem. Další roztoky byly připravovány postupně ředěním roztoku o koncentraci 0,05 mg/ml.

Vzorky laváží po centrifugaci v tomto experimentu nebyly ředěny. Všechny připravené roztoky byly pipetovány do černé 96 jamkové destičky. Každý roztok byl přenesen do 3 jamek po 100 μ l. Jako srovnávací roztok byl opět použit PBS s azidem. Měření fluorescence probíhalo při excitační vlnové délce 494 nm a emisní vlnové délce 518 nm. „Gain“ byl nastaven na hodnotu 53. Mód měření byl nastaven bez víčka a shora. Získané hodnoty byly dále vyhodnocovány v programu Excel 2016.

4 Výsledky

4.1 Značení protilátky pomocí FITC

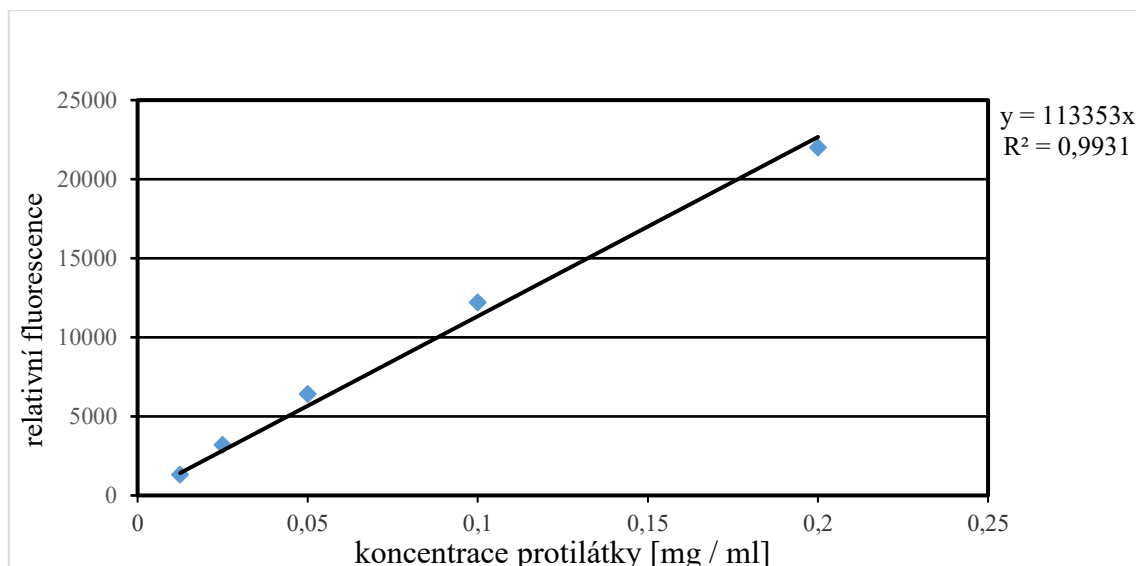
Pro zjištění množství protilátky v laváži plic musela být slepičí protilátka nejdříve označena fluorescenčním barvivem FITC. Před začátkem značení byl z roztoku protilátky odstraněn azid sodný pomocí dialýzy v uhličitanovém pufru. Po konjugaci protilátky s FITC a po dialýze, kdy byl odstraněn nenavázaný FITC, byla zjištěna koncentrace proteinu v konjugátu. Pro výpočet koncentrace proteinu v konjugátu musela být změřena absorbance při 280 a 494 nm. Vypočítaná hodnota koncentrace proteinu v konjugátu odpovídá 8,21 mg/ml. Míru označení proteinu fluoresceinem lze vyjádřit jako molární poměr fluoresceinu ku proteinu, tzv. poměr F/P. Vypočítaná hodnota F/P konjugátu je 0,25.

4.2 Intratracheální instilace

Metodou intratracheální instilace byla aplikována experimentálním zvířatům značená protilátka FITC přímo do plic. Pro tento experiment bylo použito 6 myší. Při průběhu u dvou z nich došlo ke špatné aplikaci protilátky, kdy nebylo aplikované veškeré množství protilátky. Z toho důvodu nebyly výsledky brány v úvahu.

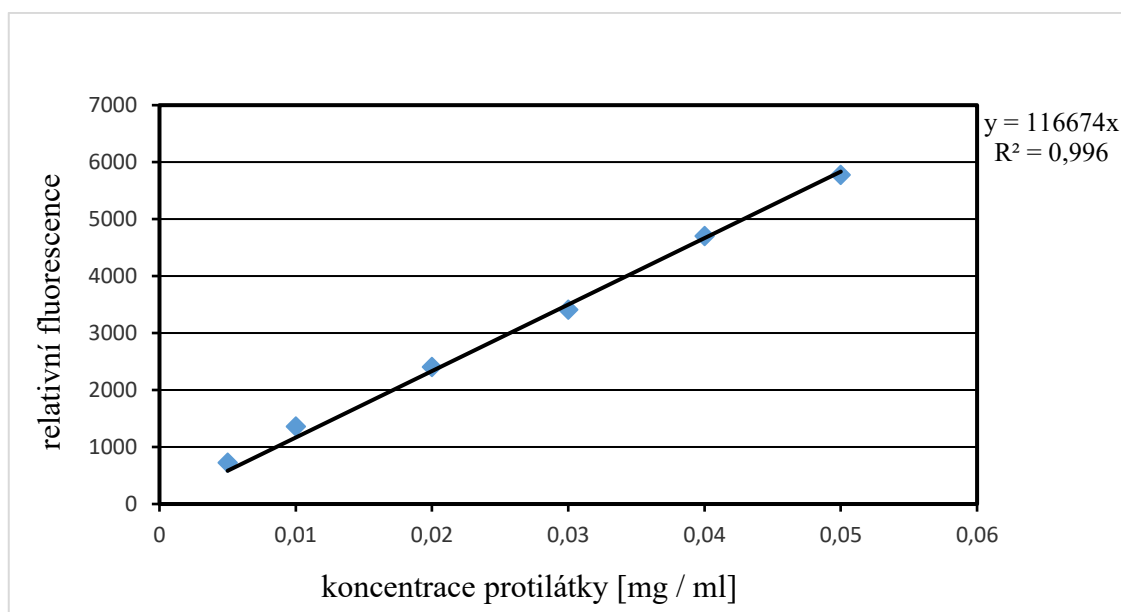
Po vyjmutí plic byla provedena BAL, pomocí které byly získány dvě laváže. U laváží byla po centrifugaci (viz kap. 3.2) změřena fluorescence na spektrofotometru Tecan Infinite. Zároveň byla naměřena kalibrační závislost v rozmezí hodnot koncentrací od 0,0125 až 0,2 mg/ml (viz. obr.8, str. 36).

Při přípravě kalibrační závislosti bylo předpokládáno, že při inhalačním experimentu bude koncentrace protilátky v laváži nižší než při intratracheální instilaci. Proto byla vytvořena nová kalibrační závislost o koncentraci 0,005 – 0,05 mg/ml (viz obr. 9, str. 36).



Obr. 8: Kalibrační závislost relativní fluorescence na koncentraci protilátky značené FITC.

Pro hodnoty koncentrací 0,0125 – 0,2 mg/ml. Použity hodnoty po odečtení srovnávacího roztoku, které byly průměrem tří naměřených hodnot. Jako srovnávací roztok použito PBS s azidem. Hodnota fluorescence srovnávacího roztoku 5412,3. Měřeno na 96 jamkové černé destičce. Nastavení spektrofotometru Tecan Infinite: 494 nm / 518 nm; „gain“ 53; mód měření vrchní, bez víčka.



Obr. 9: Kalibrační závislost relativní fluorescence na koncentraci protilátky značené FITC pro inhalační experiment. Pro hodnoty koncentrace v rozmezí 0,05 – 0,005 mg/ml. Použity hodnoty fluorescence po odečtení srovnávacího roztoku jsou průměrem tří naměřených hodnot. Jako srovnávací roztok použito PBS s azidem. Hodnota fluorescence srovnávacího roztoku 5118,6. Měřeno na 96 jamkové černé destičce. Nastavení spektrofotometru Tecan Infinite: 494 nm / 518 nm; „gain“ 53; mód měření vrchní, bez víčka.

Z kalibrační závislosti byla zjištěna koncentrace a následně množství značené protilátky v laváži. V tabulce 1 jsou hodnoty relativní fluorescence po odečtu srovnávacího roztoku a vypočítané množství protilátky v laváži. Ze získaných hodnot je vidět, že množství protilátky značené FITC v laváži je průměrně 77 μg . To odpovídá zhruba 31 % z celkové aplikované dávky protilátky do plic. U opakovaných laváží byly získány hodnoty fluorescence nižší. Výsledné množství protilátky v opakovaných lavážích je v rozmezí od 20 do 36 μg , což odpovídá přibližně 8,1 – 14,5 % z celkové aplikované dávky protilátky.

Tabulka 1: Fluorescence získaných laváží a množství protilátky v laváži.

Myš	Relativní fluorescence	Množství protilátky / μg	Procento z celkového množství / %
1.	14046,0	71	28,4
2.	13499,0	76	30,4
3.	15145,0	85	34,0
4.	13659,3	75	30,0

Hodnoty relativní fluorescence laváží jsou průměry ze tří naměřených hodnot. Laváž provedena PBS s azidem. Jako srovnávací roztok PBS s azidem. Od naměřených hodnot fluorescence byla odečtena fluorescence srovnávacího roztoku 5412,3. Měřeno na 96 jamkové černé destičce. Nastavení spektrofluorimetru Tecan Infinite: 494 nm / 518 nm; „gain“ 53; mód měření vrchní, bez víčka. Aplikované celkové množství značené protilátky FITC bylo 0,25 mg.

4.3 Inhalační experiment

Abychom zjistili množství protilátky, které je myš schopná nainhalovat, musel být proveden inhalační experiment. Tento experiment byl uspořádán tak, že nejdříve inhalovali tři myši společně a další tři individuálně. Při inhalaci nebyla pozorována žádná změna jejich zdravotního stavu. Při experimentu docházelo ke kondenzaci nebulizované protilátky, která zůstávala na stěnách nádoby.

V tabulce 2 jsou hodnoty relativní fluorescence a zjištěné množství protilátky v laváži. Z kalibrační závislosti (obr. 9, str. 35) bylo zjištěno množství protilátky v laváži. Tato hodnota odpovídá přibližně 31 % protilátky, které lze získat laváží z plic po aplikaci intratracheální instilací. Ze známé hodnoty množství protilátky v laváži bylo dopočítáno 100% celkové nainhalované protilátky. Při skupinové inhalaci se tato hodnota pohybuje v rozmezí od 15 do 24 μg protilátky. U inhalace jednotlivců je tato hodnota vyšší. Odpovídá hodnotám v rozmezí od 28 do 36 μg protilátky.

Tabulka 2: Získané hodnoty pro inhalační experiment.

Myš		Relativní fluorescence	Množství protilátky / μg	Procento z celkového množství / %
1	Skupina	2822,7	7,4	0,24
2		2576,4	6,1	0,20
3		1732,7	4,8	0,15
4	Jednotlivci	4537,9	8,4	0,28
5		3715,7	10,9	0,36
6		3871,9	9,1	0,30

Hodnoty relativní fluorescence laváží jsou průměry ze tří naměřených hodnot. Jako srovnávací roztok použito PBS s azidem. Hodnota srovnávacího roztoku 5118,6. Laváž provedena PBS s azidem. Množství protilátky je množství získané v laváži. Z celkového nainhalovaného množství je to přibližně 31 %. Procento odpovídá hodnotě z celkového aplikovaného množství protilátky. Aplikované celkové množství protilátky značené FITC do nebulizéru bylo 10 mg.

Stejně jako u intratracheální instilace byla po inhalaci provedena BAL a byly získány laváže dvě. V opakované laváži po skupinové inhalaci bylo zjištěno množství protilátky v rozmezí od 4 do 6 μg protilátky, množství nainhalované protilátky je 12 – 16 μg , což odpovídá 12 – 19 % z celkového aplikovaného množství protilátky. U inhalace individuální jsou hodnoty vyšší než u inhalace skupinové. Množství protilátky získané z opakované laváže je přibližně 7 μg . Celkové nainhalované množství je 22 – 24 μg , které odpovídá 22 – 24 % z celkové aplikované dávky.

5 Diskuze

Hlavním důvodem časté nemocnosti a nakonec úmrtí pacientů CF jsou infekce plic způsobené PA. Chronické infekce vedou k destrukci tkáně plic a následné ztrátě jejich funkce. V ochraně proti infekci PA je využívána antibiotická léčba, která často selhává kvůli vzniku rezistence bakterií. Možná alternativa k antibiotikům je podávání slepičích protilátek jako prostředku pasivní imunizace pacientům s CF. Při studiu této alternativy bylo zjištěno, že slepičí protilátky mají schopnost bránit adhezi PA na epitelální buňky plic *in vitro* [43]. Také bylo prokázáno, že nezpůsobují v plicích žádné zánětlivé reakce [40]. Tyto poznatky dávají prostor dalším vědeckým studiím. Při experimentu, kdy byly testovány inhalované protilátky proti PAiIL nebyla jejich účinnost prokázána. Tento neočekávaný výsledek by mohl být způsoben nedostatečným množstvím inhalované protilátky, které nedokázalo lektin inhibovat [42]. Naopak slepičí protilátka mohla napomoci rozvoji infekci interakcí lektinu se sacharidovými částmi protilátky. V této práci bylo proto zjišťováno, jaké množství slepičí protilátky je schopné experimentální zvíře inhalovat.

Tato práce se zabývá problematikou, o které nelze vyhledat informace v žádných vědeckých publikacích. Z tohoto důvodu nebylo možné získané výsledky porovnávat s jinými. Jedinou možností, jak získat potřebné informace o množství inhalované protilátky v plicích, bylo provést potřebné inhalační experimenty a tuto protilátku kvantifikovat. Slepici protilátku bylo třeba označit barvivem, aby byla detekovatelná. K tomuto značení bylo použito fluorescenční barvivo FITC. Konjugace protilátky s FITC probíhala v hmotnostním poměru 1:1 v roztoku DMSO. Koncentrace proteinu v konjugátu byla 8,21 mg/ml. Stanovený molární poměr F/P má hodnotu 0,25. Správně značená protilátka by měla mít hodnotu poměru od 0,3 do 1, ale záleží na prostředí [44]. Dostatečná míra označení je nezbytná pro vysokou citlivost měření, avšak přílišné označení může narušit strukturu a funkci proteinu. Při nadměrné modifikaci protilátky FITC může také docházet k samozhášení. Hodnota míry značení 0,25 leží pod hranicí rozmezí pro vhodné značení. Podle získaných výsledků lze říci, že pro naše účely bylo toto značení dostatečné i přes nižší hodnotu poměru F/P.

Po konjugaci protilátky s FITC bylo nejdříve třeba zjistit, jaké množství slepičí protilátky značené FITC po aplikaci intratracheální instilací je možno získat z plic pomocí

BAL. K tomuto experimentu bylo využito experimentálních zvířat, samců myši kmene ICR CD1. Pomocí BAL bylo zjištěno, že je možné získat laváží přibližně 31 % protilátky z celkového aplikovaného množství. Tento výtěžek je relativně nízký a z toho důvodu bylo zjišťováno, zda nedochází ke zhášení fluorescence slepičí protilátky značené FITC možnou kontaminací laváže. Kontaminace mohla být způsobena například krví či mesocainem. Podle získaných hodnot fluorescence lze říci, že testované možnosti kontaminace nemají žádný vliv na fluorescenci FITC.

Díky zjištěným výsledkům při experimentu s intratracheální instilací bylo možné dále pokračovat metodou inhalace. Během inhalačního experimentu myši inhalovaly nejdříve ve skupině a poté individuálně. Dle naměřených hodnot lze říci, že byla efektivnější individuální inhalace než skupinová. Lze předpokládat, že je to zapříčiněno tím, že při individuální inhalaci je myš osamocena v malém prostoru, kdežto při skupinové inhalaci je větší prostor s více zvířaty a stejnou aplikovanou dávkou protilátky. Množství protilátky, které bylo získáno laváží je přibližně 9 μg a celkové nainhalované množství odpovídá přibližně 31 μg protilátky, což je 0,31 % z celkové aplikované dávky. Zajímavé je, že při aplikaci intratracheální instilací bylo opakovanou laváží získáno přibližně o jednu třetinu menší množství protilátky oproti laváží prvotní. Zatímco po inhalaci bylo v první laváží i v opakované laváží získáno téměř srovnatelné množství protilátky. To může poukazovat na to, že je protilátka při inhalaci lépe distribuována v plicích než při intratracheální instilaci.

Ze získaných výsledků lze odvodit, že inhalované množství slepičí protilátky je nedostatečné pro pasivní imunizaci v obraně proti infekci PA. Problémem je, že slepice je schopná vyprodukovat zhruba 2 % specifické protilátky. Toto je řešitelné afinitní purifikací protilátky, kdy je získána pouze specifická protilátka. Potom by množství specifické protilátky podané inhalačně mělo být dostačující při obraně proti infekci PA.

Podle získaných skutečností by bylo vhodné v dalších experimentech ověřit, zda-li toto inhalované množství protilátky skutečně dokáže zabránit rozvoji infekce PA v plicích.

6 Souhrn

- Slepíčí preimunní protilátka byla označena FITC v molárním poměru F/P o hodnotě 0,25.
- Byla zjištěno, že po aplikaci protilátky metodou intratracheální instilace lze získat 31 % protilátky v laváži plic.
- Experimentální zvířata jsou schopna nainhalovat přibližně 31 μg , což odpovídá 0,31 % z celkové aplikované dávky protilátky.

7 Literární zdroje

1. Sheppard, D. N.; Welsh, M. J.: Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiological reviews*. 1999:79, 23 – 45.
2. Mckone, E. F.: Cystic Fibrosis. *International Encyclopedia of Public Health*. Elsevier, 2008, 65 – 70.
3. Morales, M. M.; Capella M. A. M.; Lopes A. G.: Structure and function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 1999:32, 1021-1028.
4. Vávrová, V.: *Cystická fibróza*. Grada Publishing, a. s., Praha 2006.
5. Lynch, J.; Sayah, D.; Belperio, J.; Weight, S.: Lung Transplantation for Cystic Fibrosis: Results, Indications, Complications, and Controversies. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2015:36, 299-320.
6. Davies, J. C.; Alton, E. W. F. W.; Bush, A.: Cystic fibrosis. *British Medical Journal*. 2007:335, 1255-1259.
7. Vankeerberghen, A.; Cuppens, H.; Cassiman, J. J.: The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *Journal of Cystic Fibrosis* . 2002:1, 13-29.
8. Lukacs, G. L.; Verkman, A.S.: CFTR: folding, misfolding and correcting the $\Delta F508$ conformational defect. *Trends in Molecular Medicine*. 2012:18, 81-91.
9. Goss, C. H.; Burns, J. L.: Exacerbations in cystic fibrosis 1: Epidemiology and pathogenesis. *Thorax*. 2007:62, 360-367.
10. Wine, J. J.: The genesis of cystic fibrosis lung disease. *Journal of Clinical Investigation*. 1999:103, 309-312.
11. Wilschanski, M.; Novak, I.: The Cystic Fibrosis of Exocrine Pancreas. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2013:3, a009746-a009746.
12. Thomsen, K.; Christophersen, L.; Bjarnsholt, T.; Jensen, P. Ø.; Moser, C.; Høiby, N.; McCormick, B. A.: Anti-Pseudomonas aeruginosa IgY Antibodies Induce Specific Bacterial Aggregation and Internalization in Human Polymorphonuclear Neutrophils. *Infection and Immunity*. 2015:83, 2686-2693.
13. Lyczak, J. B.; Cannon, C. L.; Pier, G. B.: Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002:15, 194-222.

14. Abin, Ch.; Mitchell, E. P.; Pokorná, M.; Gautier, C.; Utile, J. – P.; Wimmerová, M.; Imberty, A.: Binding of different monosaccharides by lectin PA-III from *Pseudomonas aeruginosa*: Thermodynamics data correlated with X-ray structures. *FEBS Letters*. 2006:580, 982-987.
15. Thomsen, K.; Christophersen, L.; Bjarnsholt, T.; Jensen, P.Ø.; Moser, C.; Hoiby, N.: Anti- *Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies augment bacterial clearance in a murine pneumonia model. *Journal of Cystic Fibrosis*. 2016:15, 171-178.
16. Hoiby, N.; Ciofu, O.; Bjarnsholt, T.: *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. *Future Microbiology*. 2010:5, 1663-1674.
17. Sabharwal, S.: Gastrointestinal Manifestations CysticFibrosis. *Gastroenterology & Hepatology*. 2016:12, 43-47.
18. Parisi, G. F.; Di Dio, G.; Franzonello, Ch.; Gennaro, A.; Rotolo, N.; Lionetti, E.; Leonardi, S.: Liver Disease in Cystic Fibrosis. *Hepatitis Monthly*. 2013:13.
19. Kobelska-Dubiel, N.; Klinecicz, B.; Cichy, W.: Liver disease in cystic fibrosis. *Gastroenterology Review*. 2014:3, 136-141.
20. Mudr. Jakubec, P.: Cystická fibróza. *Interní medicína v praxi*. 2006:5, 235-239.
21. Mudr. Balašáková, M.: *Dizertační práce*. Praha 2010.
22. Ong, T.; Marshall, S. G.; Karczeski, B. A.; et al.: *Cystic Fibrosis and Congenital Absence of the Vas Deferens*. University of Washington, Seattle 2001.
23. Rosenstein, B. J.; Cutting, G. R. T.: The diagnosis of cystic fibrosis: A consensus statement. *The Journal of Pediatrics*. 1997:132, 589-595.
24. Bush, A.: *Cystic fibrosis in the 21st century*. Karger, New York 2006.
25. Bell, S. C.; Robinson, P. J.: Exacerbations in cystic fibrosis: 2. Prevention. *Thorax*. 2007:62, 723-732.
26. Edmondson, C.; Davies, J. C.: Current and future treatment options for cystic fibrosis lung disease: latest evidence and clinical implications. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2016:7, 170-183.
27. Křivánková, M.; Hradová, M.: *Somatologie: učebnice pro střední zdravotnické školy*. Grada, Praha 2009.
28. Novotný, I.; Hruška, M.: *Biologie člověka*. 5. rozšířené a upravené vydání. Fortuna, Praha 2015.
29. Janeway, C. J.; Travers, P.; Walport, M, et al. The structure of a typical antibody molecule *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5. vydání. Garland Science, New York 2001.

30. Hořejší, V.: *Základy imunologie*. 5. vydání. Triton, Praha 2013.
31. Schroeder, H. W.; Cavacini, L.: Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010:125, 41-52.
32. Müller, S.; Schubert, A.; Zajac, J.; Dyck, T.; Oelkrug, C.: IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutrition Journal*. 2015:14.
33. Jílek, P.: *Imunologie: stručně, jasně, přehledně*. Grada Publishing, a.s., Praha 2014.
34. Hanly, W. C.; Artwohl, J. E.; Bennett, B. T.: Review of Polyclonal Antibody Production Procedures in Mammals and Poultry. *ILAR Journal*. 1995:37, 93-118.
35. Nelson, P. N.; Reynolds, G. M.; Waldron, E. E.; Ward, E.; Giannopoulos, K.; Murray, P. G.: *Demystified: Monoclonal antibodies*. *Molecular Pathology*. 2000:53, 111-117.
36. Warr, G. W.; Magor, K. E.; Higgins, D. A.: IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunology Today*. 1995:16, 392-398.
37. Tini, M.; Jewell U.R.; Camenisch, G.; Chilov, D.; Gasmann, M.: Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2002:131, 569-574.
38. Li, X.; Wang, L.; Zhen, Y.; Li, S.; Xu, Y.: Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non- antibiotic production enhancers for use in swine production: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2015:6.
39. Keller, M. A.; Stiehm, E. R.: Passive Immunity in Prevention and Treatment of Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000:13, 602-614.
40. Hadrabová, J.; Majerová, B.; Černá, V.; Moserová, M.; Holuša, R.; Mandys, V.; Stiborová, M.; Stříž, I.; Hodek, P.: Chicken immunoglobulins for prophylaxis: Effect of inhaled antibodies on inflammatory parameters in rat airways. *Journal of Applied Biomedicine*. 2015:13, 19-22.
41. Rahman, S.; Van Nguyen S.; Icatlo, J. F. C.; Umeda, K.; Kodama, Y.: Oral passive IgY-based immunotherapeutics: A novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2013:9, 1039- 1048.
42. Hadrabová, J.: *Diplomová práce*. PřF UK, Praha 2015.

43. Vašková, L.; Nosková, L.; Bláhová, B.; Wimmerová, M.; Dřevínek, P.; Kubíčková, B.; Stiborová, M.; Hodek, P.: Evaluation of anti-PAIIL lectin hen yolk antibody as an agent inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence to epithelial cells. *Monatshefte für Chemie - Chemical Monthly*. 2016:147, 889-896.
44. Holtzhauer, M.: *Basic methods for the biochemical lab*. Springer, Berlín 2006.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovateli.

Jméno a příjmení Adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka